

MUTAGENESIS OF *in vitro* MATERIAL FROM *Pseudotsuga menziesii* AND OBTAINING MUTANT LINES

MUTAGENESIS DE MATERIAL *in vitro* DE *Pseudotsuga menziesii* Y OBTENCIÓN DE LÍNEAS MUTANTES

Castillo-Martínez, C. R.¹; García-Campusano, F.¹, Vallejo-Reyna, M., A.^{1*}, Reyes-Martínez, I.¹ y De la Cruz-Torres E.²

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. CENID-COMEF. Av. Progreso No. 5, Colonia Barrio de Santa Catarina, Delegación Coyoacán, Ciudad de México. ²Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. Carretera México Toluca- La Marquesa s/n, Ocoyoacac, Estado de México. C.P. 52750.

*Autor para correspondencia: vallejo.miguel@inifap.gob.mx

ABSTRACT

Objective: To generate mutant lines of smaller size of *Pseudotsuga menziesii*, by starting from seminal and vegetative material exposed to different doses of gamma rays.

Design/methodology/approximation: A completely randomized design was used; seeds and embryos isolated from *P. menziesii* were irradiated with a source of gamma-ray; the LD50 was determined for each tissue type 150 and 18 Gy, respectively. A total of 750 explants were irradiated, their growth was evaluated at 60 days, selecting the individuals that showed a growth reduction greater than 30%. In order to multiply the *in vitro* lines, the optimal medium recommended for the species was evaluated with the combination of two growth regulators and three concentrations to determine which generated the highest number of shoots per explant. The growth was measured and compared to the control by the Tukey test at a level of 5% confidence.

Results: It was found that the dose of 12 Gy in vegetative tissues propagated *in vitro* allows to generate mutations that can give rise to mutant lines of interest according to the objective of the selection, which for this study was the reduction of growth; three mutant lines were selected and a means to multiply the generated lines was determined.

Limitations of the study/implications: Genetic improvement programs in forest species should be projected in the long term; mutagenesis is random, in addition to generating chimeras that can make it difficult to fix the selected character.

Findings/conclusions: The dose of 12 Gy gave rise to three mutant lines with growth reduction greater than 30% in relation to the control, and the DCR medium BA 0.25 mg L⁻¹+ANA 0.1 mg L⁻¹ allowed generating an average of 9.1 shoots per explant on average at 60 days.

Keywords: growth reduction, propagation, mini-trees.

RESUMEN

Objetivo: Generar líneas mutantes de menor porte de *Pseudotsuga menziesii*, partiendo material seminal y vegetativo expuesto a diferentes dosis de rayos gamma.

Diseño/metodología/aproximación: Se empleó un diseño completamente al azar, se irradiaron con una fuente de



rayos gamma semillas y embriones aislados de *P. menziesii*, se determinó la DL50 para cada tipo de tejido 150 y 18 Gy respectivamente. Se irradiaron un total de 750 explantes, se evaluó su crecimiento a los 60 días seleccionando los individuos que mostrara una reducción del crecimiento mayor al 30%. Para poder multiplicar las líneas *in vitro* se evaluó el medio óptimo recomendado para la especie con la combinación de dos reguladores de crecimiento y tres concentraciones para determinar cuál generaba el mayor número de brotes por explante. El crecimiento se midió y se comparó con respecto al testigo por la prueba de Tukey a un nivel del 5% de confianza.

Resultados: Se encontró que la dosis de 12 Gy en tejidos vegetativo propagados *in vitro* permite generar mutaciones que pueden dar origen, según el objetivo de la selección a líneas mutantes de interés, para este estudio fue la reducción del crecimiento, se lograron seleccionar tres líneas mutantes y determinar un medio para multiplicar las líneas generadas.

Limitaciones del estudio/implicaciones: Los programas de mejoramiento genético en especies forestales deben ser proyectados a largo plazo, las mutagénesis es aleatoria, además de generar quimeras que pueden dificultar fijar el carácter seleccionado.

Hallazgos/conclusiones: La dosis de 12 Gy dio origen a tres líneas mutantes con reducción del crecimiento mayor al 30% con respecto al testigo y el medio DCR BA 0.25 mg L⁻¹+ANA 0.1 mg L⁻¹ permitió generar un promedio de 9.1 brotes por explante en promedio a los 60 d.

Palabras clave: reducción del crecimiento, propagación, mini-árboles.

Si bien en el norte del país la regeneración natural de *Pseudotsuga* es aceptable (Domínguez *et al.*, 2004), lo limitado de su distribución y la vulnerabilidad de la especie amerita estudios y proyectos enfocados al aprovechamiento sustentable y conservación (Domínguez-Álvarez, 1994). Los mayores problemas de la especie se agudizan en la región sur de su distribución, particularmente en Hidalgo, Tlaxcala y Oaxaca, México, donde la regeneración natural es escasa a consecuencia del bajo número de individuos en las poblaciones, lo que promueve la autopolinización e infertilidad generando alto porcentaje de semillas vanas y baja capacidad de germinación (Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996).

El cultivo *in vitro* tiene el potencial de multiplicar individuos maduros considerados genotipos elite (Villalobos *et al.*, 1983; Thorpe y Harry, 1991). El uso de técnicas de cultivo *in vitro* para la regeneración de especies forestales se ha extendido considerablemente desde que se obtuvo la primera plántula de *Pinus palustris* en 1975 (Sommer *et al.*, 1975; Aitken-Christie y Thorpe, 1984; Von Arnold, 1988). Desde entonces, se han generado protocolos para la micropropagación de más de cien especies de árboles forestales, de las cuales una tercera parte son gimnospermas, con particular énfasis en especies del género *Pinus* (Thorpe *et al.*, 1991).

Cuando se decide inducir mutagénesis en alguna especie vegetal (agrícola o forestal), deriva del hecho que se tiene un objetivo inicial que puede ser tan amplio como solo generar variabilidad dentro de poblaciones con alto grado de endogamia, o tener fines muy

INTRODUCCIÓN

El pinabete o *Pseudotsuga menziesii* es una especie económicamente importante en EUA y Europa Central, el uso tradicional de esta especie es con fines maderables debido a su fuste recto y limpio, por lo que se utiliza para chapado y contrachapado y la madera aserrada suele usarse como material de construcción (USDA Forest Service, 2017). En México, su explotación maderable es limitada debido a que su crecimiento está confinado a laderas de difícil acceso. Sin embargo, debido a la suavidad de sus hojas, su color verde-azulado, así como su agradable y característico aroma es una de las especies favoritas para usarse como árbol de navidad (CONABIO, 2017; Vargas *et al.*, 2004) por lo que hay más de 30 productores certificados de *Pseudotsuga menziesii* para comercializarlos con tal fin (CONAFOR, 2017). Dentro de la problemática de la especie esta el hecho de que las poblaciones actuales del género *Pseudotsuga* son relictos de una distribución antigua de mayor amplitud (Farjon, 1990; Debreczy y Rácz, 1995). Sin embargo, debido al cambio de uso de suelo boscoso para agricultura y ganadería, a la tala inmoderada, el sobrepastoreo del sotobosque, incendios forestales y el ataque de plagas a semillas y estróbilos, se ha reducido la superficie originalmente ocupada por este taxón. Por ello, en distintas regiones del país hay problemas para el uso y conservación de este recurso (Domínguez-Álvarez, 1994; Pérez-Sánchez, 1996; Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996).

concretos, tales como la resistencia a factores biótico (plagas y enfermedades) y abióticos (resistencia a salinidad altas o bajas temperaturas, sequía etcétera), modificaciones en la estructura y morfología de las plantas (formas, tamaño y coloración).

En el sector forestal, la mutagénesis ha sido utilizada para el mejoramiento de especies tropicales y coníferas. Existe interés particular en modificar la tasa de crecimiento, fenología, conformación de los árboles, calidad de la producción de madera o de celulosa para la industria del papel y desde luego la tolerancia o resistencia a factores que limitan la producción en plantaciones comerciales. Por ejemplo, la irradiación con rayos gamma de semillas de *Acacia nilotica* y *Prosopis juliflora* (Fabaceae) generó fenotipos con características favorables para la agroforestería: árboles vigorosos con tronco simple; troncos largos o cortos; troncos gruesos o estrechos; espinas permanentes o caducas; formas espinosas o sin espinas y ramas compactas o extendidas (Goel y Behl, 2005).

La exposición de semillas de *Pinus wallichiana* y *Pinus kesiya* a 100 Gy dió como resultado una reducción de 50% en la tasa de crecimiento de las plantas comparadas con las no irradiadas (Thapa, 2004). En *P. oocarpa* se demostró que el uso de la radiación gamma tuvo efectos directos en las propiedades físicas de la madera como el crecimiento e incremento o decremento de masa (Rezende et al., 1999). Recientemente se ha planteado también la utilidad de usar dosis bajas de radiación para promover respuestas fisiológicas, como el crecimiento temprano en especies como *Abies religiosa* y *Pinus hartwegii* (Iglesias et al., 2012). Con base en lo anterior, el objetivo fue generar líneas mutantes de menor porte de *Pseudotsuga menziesii*, partiendo material seminal y vegetativo expuesto a diferentes dosis de rayos gamma.

MÉTODOS Y MATERIALES

Material inicial

Se realizaron los ensayos con semillas de *P. menziesii* y embriones aislados, tanto semillas como embriones, tuvieron el mismo origen, procedentes del mismo lote de semilla de árboles de la región de Terrenate, estado de Tlaxcala, México, y se recolectaron en febrero de 2016. En el caso de las semillas el proceso de irradiación fue directa y de los embriones pasaron por un proceso de manipulación *in vitro* previo a su exposición a radiación gamma.

Preparación de medios de cultivo usados en embriones aislados y para la recuperación y multiplicación de material irradiado

Se evaluaron dos medios de cultivo; el primero para el establecer e irradiar embriones, que fue el medio Murashige y Skoog (MS) (1962), mientras que para la recuperación y multiplicación de embriones después de ser expuestos a radiación gamma se usó el medio DCR con la combinación de los siguientes reguladores de crecimiento BA 0.25, 0.5 mg L⁻¹, mT 0.25, 0.5 mg L⁻¹ y ANA 0.1 mg L⁻¹, a los medios anteriores se les adicionaron 9 g L⁻¹ de agar y 30 g L⁻¹ de sacarosa, en todos los casos el pH se ajustó a 5.7 y mediante un despachador se depositaron 10 ml de medio a los tubos de ensayo, los cuales después fueron esterilizados.

Tren de desinfección de semillas para aislar embriones

Para la desinfección de las semillas se colocaron en un tubo, con tapa con peróxido de hidrógeno al 3% v/v, por 24 h, transcurrido el tiempo se decantó el peróxido y se enjuagaron las semillas en tres veces con agua estéril. Los siguientes pasos se realizaron en campana de flujo laminar. Se agregó nuevamente peróxido de hidrógeno 3% por 15 min, después decantó el líquido y agregó cloro al 20% v/v por 12 min, posteriormente se debe eliminar el cloro y realizaron cinco enjuagues con agua destilada estéril. Las semillas ya deben estar completamente desinfectadas y listas para continuar con el proceso de aislamiento de embriones.

Extracción de embriones y siembra en medio de cultivo

La siembra se realizó en condiciones asépticas en la campana de flujo laminar. El proceso consistió en extraer el embrión de las cubiertas seminales y megagametofito. El aislamiento (o disección de embriones) debe realizarse bajo condiciones de estricta asepsia. La semilla requiere previamente ser desinfectada. Para poder realizar el aislamiento correcto de los embriones que se debe colocar con su ala hacia arriba, al mantener firme la semilla en esta posición se realiza un corte muy superficial y longitudinal, que se permita la libre expulsión del embrión, una vez realizado este corte se debe presionar desde la parte de atrás de la semilla para que el embrión emerge (Figura 3).

DL50 con radiación gamma

Con la finalidad de determinar la DL50 tanto de semillas como de embriones aislados se realizó un ensayo con diferente dosis de radiación gamma. En el caso de semillas se utilizaron lotes de 100 semillas en tubo de cultivo

y una repetición por dosis 0, 25, 50, 75, 10, 150, 250, 300 y 400 Gy, las semillas irradiadas se colocaron en cajas Petri para germinar y se evaluó la tasa de germinación cada semana hasta llegar a 10 semanas para obtener el porcentaje final. Con respecto a los embriones aislados se utilizaron 25 embriones germinados *in vitro* en cajas petri y tres repeticiones por dosis 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 y 27 Gy posterior a la radiación los embriones se transfirieron a medio fresco y se evaluó la supervivencia en 30 d.

Selección y propagación de líneas mutantes

Una vez que se dermino cual sería la dosis de radiación gamma se irradiaron tanto semillas como embriones, usando 150 Gy para semillas, 9 y 12 Gy para embrines aislados. El material recuperado después de ser irradiado se estableció en un medio base MS, para seleccionar todos aquellos individuos que presentaron una disminución de al menos un 25% de su crecimiento, y para poder incrementar estas líneas iniciales se uso el mejor medio para multiplicación DCR más BA 0.25 mg L⁻¹+ANA 0.1 mg L⁻¹ para incrementar las líneas y hacer una evaluación en la V2 propagación vegetativa y comparar su crecimiento con respecto a l testigo.

Análisis de datos

Se utilizó un diseño completamente al azar Se realizó un ANOVA y comparación de medias de Tuckey ($p \leq 0.05$); estos análisis se realizaron con el programa estadístico R, versión 3.4.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Medio de cultivo para multiplicación de líneas mutantes

El tratamiento de medio DCR con la combinación de BA 0.25 mg L⁻¹+ANA 0.1 mg L⁻¹ bndfhtdj mostro en mayor número de brotes generados a las diez semanas de 9.0 (Figura 1). Una respuesta positiva, similiar a lo encontrados Sommers (1975), con una combinación similar de reguladores, la tasa de multiplicación que se obtuvo permitió multiplicar las líneas mutantes para

evaluar hasta la generación V2 su crecimiento.

DL50 y dosis para irradiar tejidos y semillas

El efecto del tratamiento de la radiación gamma conforme a la dosis en Grey permitio determinar el rango de la DL50 en semillas de 150 Gy (Figura 1) y en embriones aislados de 18 Gy (Figura 2), de esta información se establecieron dosis para la irradiación masiva de semillas y tejidos *in vitro*, con fines de generar mutantes de interés. Para semillas se seleccionó la dosis de 150 Gy y para embriones aislados de 9 y 12 Gy

Selección y crecimiento de líneas mutantes

Despues de someter embriones aislados a radiación gamma con dosis de 9 y 12 Gy se permitio su desarrollo hasta los 30 y 60 d, para evaluar los ejemplares con un desarrollo menor a 25%, y de todos los individuos ($n=725$), se seleccionaron tres provenientes de una dosis de 12 Gy que mostraron una disminución en dicho parámetro, estos individuos se multiplicaron hasta la V2 para volver a evaluar su crecimiento (Figura 3), se observó que mantenían su patrón las tres líneas igual que lo reportado en crisantemo por Castillo *et al.* (2015) donde se logro reducir el crecimiento de una línea mutante. La línea uno (L1) mostro la reducción en crecimiento de más de 60% con respecto al testigo, por lo que se considera la más prometedora para ser utilizada en maceta como mini-árbol.

CONCLUSIONES

Fue posible obtener tres líneas mutantes promisorias a partir de embriones aislados con dosis de rayos

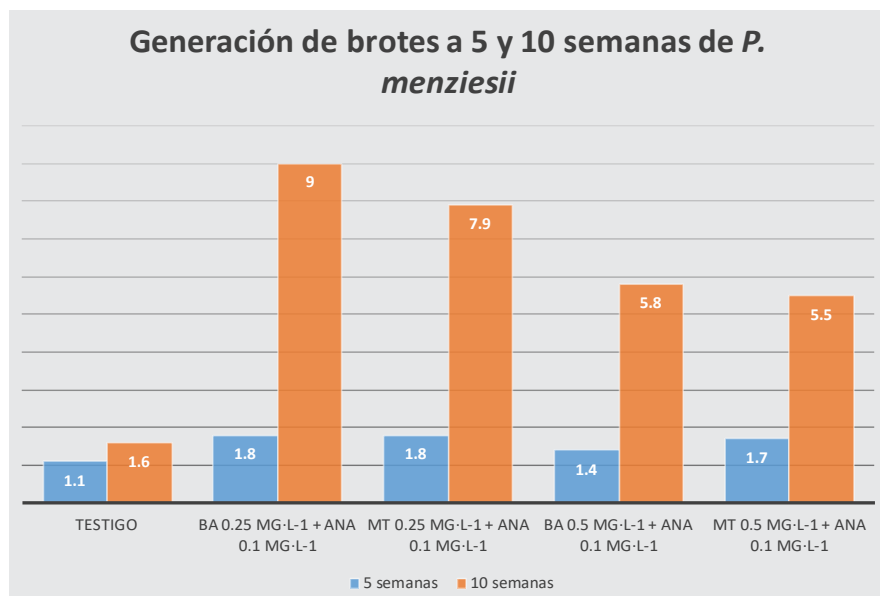


Figura 1. Respuesta en la formación de brotes por explante de *P. menziesii* en cuatro combinaciones de reguladores de crecimiento a 5 y 10 semanas.

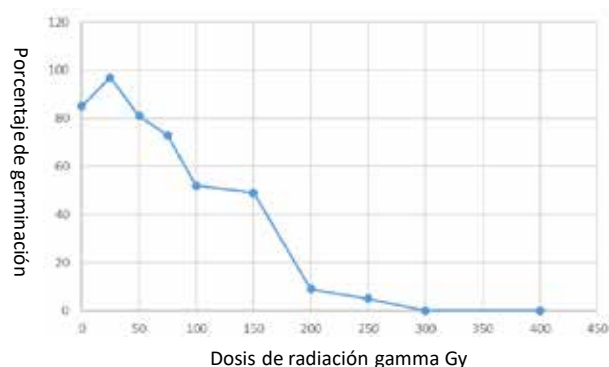


Figura 2. Respuesta de germinación de semillas de a diferentes dosis de radiación gamma después de 30 días.

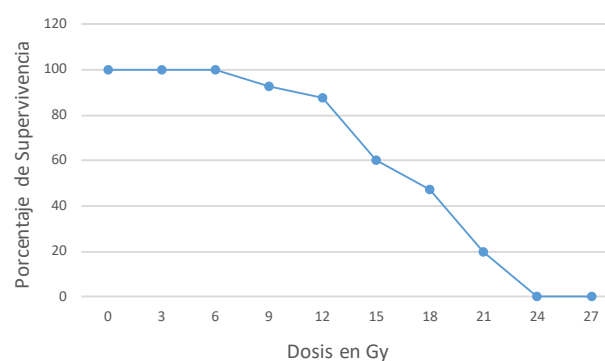


Figura 3. Respuesta de supervivencia de embriones aislados de a diferentes dosis de radiación gamma después de 30 días.

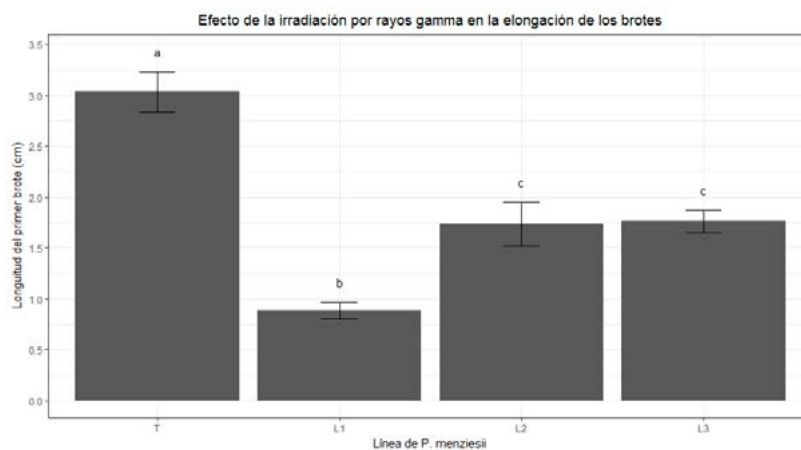


Figura 4. Crecimiento de tres líneas mutantes a 60 días, con respecto al testigo, medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

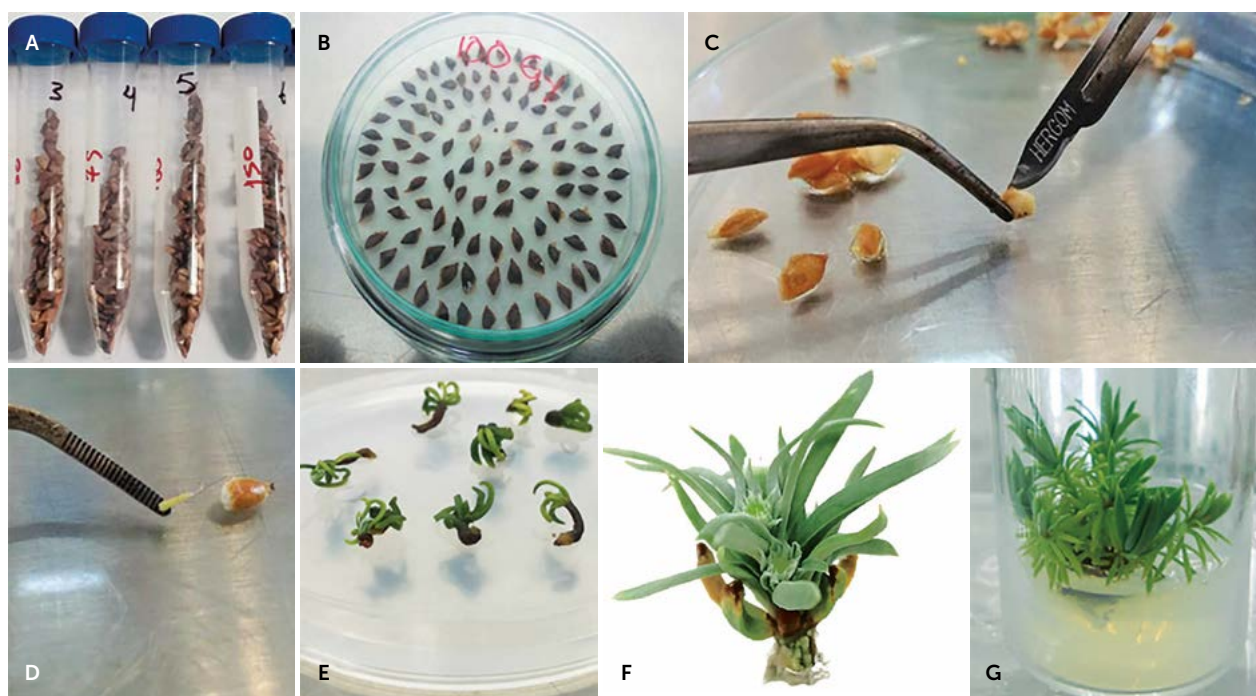


Figura 5. Semillas *P. menziesii* para ser irradiadas; A) Semillas de *P. menziesii* después de ser irradiadas; B) Aislamiento de embriones; C) Embrion aislado; D) Embriones irradiados con 12 Gy; E) Formación de nuevos brotes a 30 días de línea mutante; f) Desarrollo de brotes a 60 días de línea mutante; G).

gamma de 12 Gy después de su evaluación en la V2, la línea 1 mostró el menor crecimiento, se determinó que la mejor respuesta de generación de brotes de las líneas mutantes con un promedio de 9.1 brotes por explante se logra con el medio DCR y la combinación de BA 0.25 mg L⁻¹+ANA 0.1 mg L⁻¹.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por el financiamiento y las facilidades prestadas para la realización de la presente investigación.

LITERATURA CITADA

- Aboel-Nil, M. M. (1987). Tissue culture of Douglas-fir and Western North American conifers. In Cell and Tissue Culture in Forestry (pp. 80-100). Springer, Dordrecht.
- Acevedo-Rodríguez, R., Vargas-Hernández, J. J., López-Upton, J., & Mendoza, J. V. (2006). Effect of geographic origin and nutrition on shoot phenology of Mexican Douglas-Fir (*Pseudotsuga* sp.) seedlings. *Agrociencia*, 40(1), 125-137.
- Acosta-Pérez, R. (1992). Algunas coníferas del Estado de Tlaxcala. Folleto de divulgación No. 14, Gob. del Estado de Tlaxcala, Jardín Botánico de Tizatlán.
- Ara, H., Jaiswal, U., & Jaiswal, V. S. (2000). Synthetic seed: prospects and limitations. *Current Science*, 1438-1444.
- Aitken-Christie, J., & Thorpe, T. A. (1984). Clonal propagation: gymnosperms. Cell culture and somatic cell genetics of plants, 1, 82-95.
- Allen, G. S., & Owens, J. N. (1972). The life history of Douglas Fir. The life history of Douglas Fir.
- Bonga J.M. 2015. A comparative evaluation of the application of somatic embryogenesis, rooting of cuttings, and organogenesis of conifers. *Canadian Journal of Forest Research* 45: 379-383.
- Borzouei, A., Kafi, M., Khazaei, H., Naseriyan, B., & Majdabadi, A. (2010). Effects of gamma radiation on germination and physiological aspects of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Pak. J. Bot.*, 42(4), 2281-2290.
- Carrillo-Benitez M.G., J.L. Rodríguez-De la O, J.G. Álvarez-Martínez. 2011. Morfogénesis *in vitro* de *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca*. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 17: 273-282.
- Castillo-Martínez, C. R., la Cruz-Torrez, D., Carrillo-Castañeda, G., & Avendaño-Arrazate, C. H. (2015). Inducción de mutaciones en crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) usando radiación gamma y etil metano sulfonato. *Agroproductividad*, 8(2).
- Cheng TY, TH Voqui. 1977. Regeneration of Douglas-fir plantlets through tissue culture. *Science* 198: 306-307.
- Cortizo, M., P. Alonso, B. Fernández, A. Rodríguez, M.L. Centeno, R.J. Ordás. 2004. Micrografting of mature stone pine (*Pinus pinea* L.) trees. *Annals of forest science* 61: 843-845.
- Cruz-Nicolás J, Vargas-Hernández JJ, Ramírez-Vallejo P, López-Upton J. 2011. Diversidad genética y diferenciación de las poblaciones de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco en México. *Revista fitotecnica mexicana* 34 (4): 233-240.
- Debreczy, Z., & Rácz, I. (1995). New species and varieties of conifers from Mexico. *Phytologia*, 78(4), 217-243.
- Domínguez ÁLVAREZ, F. A., Vargas HERNÁNDEZ, J. J., López UPTON, J., Ramírez VALLEJO, P., & Guízar NOLAZCO, E. (2004). Aspectos ecológicos de *Pseudotsuga menziesii* en el ejido La Barranca, Pinal de Amoles, Querétaro. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica*, 75(2)..
- Durzan, D. J., & Gupta, P. K. (1987). Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in Douglas-fir cell suspension cultures. *Plant Science*, 52(3), 229-235.
- Farjon, A. (1990). Pinaceae. Drawings and descriptions of the genera *Abies*, *Cedrus*, *Pseudolarix*, *Keteleeria*, *Nothotsuga*, *Tsuga*, *Cathaya*, *Pseudotsuga*, *Larix* and *Picea*. Koeltz Scientific Books, D-6240 Königstein, Federal Republic of Germany. 1990. Pp. xii + 330; 117 illustrations (mostly line drawings); 124 maps. ISBN 3 87429 298 3. Forming volume 121 of *Regnum Vegetabile*; ISSN 0080-0694, DM 260.
- García-Campusano, F. 1999. Inducción de brotes y enraizamiento a partir del cultivo *in vitro* de embriones maduros de *Pseudotsuga macrolepis* Flous. Tesis de Licenciatura para obtener el grado de Licenciatura en Biología Agropecuaria. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M., & Thorpe, T. A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 32(4), 272-289.
- George, E. F. (1993). Plant propagation and micropropagation. Plant propagation by tissue culture. Part, 1, 37-66.
- Goel, V. L., & Behl, H. M. (2005). Induced variations, selections and germplasm conservation in selected tree species for afforestation programs on degraded soil sites. *Asian journal of plant sciences*, 4(3), 264-270.
- Guo, W., Li, Y., Gong, L., Li, F., Dong, Y., & Liu, B. (2006). Efficient micropropagation of *Robinia ambigua* var. *idahoensis* (Idaho Locust) and detection of genomic variation by ISSR markers. *Plant cell, tissue and organ culture*, 84(3), 343-351.
- Iglesias-Andreu, L. G., Octavio-Aguilar, P., & Bello-Bello, J. (2012). Current importance and potential use of low doses of gamma radiation in forest species. In *Gamma radiation*. InTech.
- Hermann R.K., & Lavender D. P.. 1990. *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco: Pinaceae. In: Russel, MB and BH Honkala (Eds). *Silvics of North America. Vol 1: Conifers. Agriculture Handbook* 654. Vol.1. USDA Forest Services. Washington DC.
- Jain, S. M. (2005). Major mutation-assisted plant breeding programs supported by FAO/IAEA. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82(1), 113-123.
- Jankowicz-Cieslak, J., Mba, C., & Till, B. J. (2017). Mutagenesis for Crop Breeding and Functional Genomics. In *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding* (pp. 3-18). Springer, Cham.
- Khan, S., Al-Qurainy, F., & Anwar, F. (2009). Sodium azide: a chemical mutagen for enhancement of agronomic traits of crop plants. *Environ. We Int. J. Sci. Tech*, 4, 1-21.
- Kondo, N., Takahashi, A., Ono, K., & Ohnishi, T. (2010). DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *Journal of nucleic acids*, 2010.
- Lavender, D. P. (1958). Effect of seed size on Douglas Fir seedlings. Corvallis, Or.: Oregon Forest Lands Research Center.

- Lewin B. 2000. Genes VII. Oxford University Press. Primera edición. 990 pp.
- Li, P., & Adams, W. T. (1989). Range-wide patterns of allozyme variation in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). Canadian Journal of Forest Research, 19(2), 149-161.
- Maluszynski, M. (2001). Officially released mutant varieties—the FAO/IAEA Database. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 65(3), 175-177.
- Maluszynski M, Szarejko I, & Maluszynska J (2003) Mutation techniques. In: Thomas B, Murphy DJ, Murray BG (eds) Encyclopedia of applied plant sciences. Elsevier Academic, The United States of America, pp. 186–201
- Martínez M. 1949. Las Pseudotsugas de México. Boletín de la Sociedad Botánica de México 8: 21-24.
- Mápula-Larreta, M., López-Upton, J., Vargas-Hernández, J. J., & Hernández-Livera, A. (2007). Reproductive indicators in natural populations of Douglas-fir in Mexico. Biodiversity and Conservation, 16(3), 727-742.
- Maruyama, E., Kinoshita, I., Ishii, K., Ohba, K., & Saito, A. (1997). Germplasm conservation of the tropical forest trees, *Cedrela odorata* L., *Guazuma crinita* Mart., and *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don., by shoot tip encapsulation in calcium-alginate and storage at 12-25 °C. Plant Cell Reports, 16(6), 393-396.
- Materán, M. E., Vega, M. C., Sánchez-Olate, M., Sáez, K., Rodríguez, R., & Ríos, D. (2008). Reactivación de material vegetal élite de *Pinus radiata* d. Don. Mediante microinjerto *in vitro*. Interciencia, 33(1), 66-70.
- Mba, C. (2013). Induced mutations unleash the potentials of plant genetic resources for food and agriculture. Agronomy, 3(1), 200-231.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, 15(3), 473-497.
- Oladosu, Y., Rafii, M. Y., Abdullah, N., Hussin, G., Ramli, A., Rahim, H. A., ... & Usman, M. (2016). Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 30(1), 1-16.
- Pathirana, R. (2011). Plant mutation breeding in agriculture. Plant sciences reviews, 107-126.
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and researchdan update. Bioinformatics 28, 2537e2539.
- Ragonezi, C., Klimaszewska, K., Castro, M. R., Lima, M., de Oliveira, P., & Zavattieri, M. A. (2010). Adventitious rooting of conifers: influence of physical and chemical factors. Trees, 24(6), 975-992.
- Rao, P. S., & Bapat, V. A. (1993). Micropropagation of sandalwood (*Santalum album* L.) and mulberry (*Morus indica* L.). In: Micropropagation of Woody Plants (pp. 317-345). Springer, Dordrecht.
- Reyes H., V.J., J.J. Vargas H., J. López U., H. Vaquera-Huerta. 2005. Variación morfológica y anatómica en poblaciones de *Pseudotsuga* (Pinaceae). Acta Bot. Mex. 70: 47-67.
- Reyes H., V.J., J.J. Vargas H., J. López U., H. Vaquera-Huerta. 2006. Phenotypic similarity among Mexican populations of *Pseudotsuga* Carr. Agrociencia 40: 545-556.
- Rezende, M. A. D., Guerrini, I. A., Ducatti, C. (1999). Use of gamma ray attenuation technique in the study on *Pinus oocarpa* specific mass variation of 24-years old. Inis.iaea.org. 112 pp.
- Rzedowski J. 1978. Vegetación de México. Limusa. México. 431 p.
- Sommer, H. E., Brown, C. L., & Kormanik, P. P. (1975). Differentiation of plantlets in longleaf pine (*Pinus palustris* Mill.) tissue cultured in vitro. Botanical Gazette, 136(2), 196-200.
- Shu, Q. Y., Forster, B. P., & Nakagawa, H. (2011). Plant Mutation breeding and Biotechnology, Vienna.
- Thapa, C. B. (2004). Effect of acute exposure of gamma rays on seed germination and seedling growth of *Pinus kesiya* Gord and *P. wallichiana* AB Jacks. Our Nature, 2(1), 13-17.
- Thorpe, T. A., Harry, I. S., & Kumar, P. P. (1991). Application of micropropagation to forestry. In: Micropropagation (pp. 311-336). Springer, Dordrecht.
- Vargas H., J.J., J. López U., V.J. Reyes H., A. Domínguez A., M. Mápula L. 2004. Natural populations of Douglas- fir in Mexico: current status and needs for conservation. In: Beaulieu. J. (Ed). Silviculture and the conservation of genetic resources for sustainable forest management: Proceedings of the symposium of the North American forest commission, forest genetic resources and silviculture working groups, and the International Union of Forest Research Organizations (IUFRO). Quebec City, QC, Canada. p. 26–36.
- Villalobos, V. M., & Thorpe, T. A. (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, 127-141.
- Von Arnold, S., & Hakman, I. (1988). Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA). Journal of Plant Physiology, 132(2), 164-169.
- Zobel, B., & Talbert, J. (1984). Applied forest tree improvement. John Wiley & Sons.